

用酶免疫测定法检测鱼害粘球菌的试验*

陈月英 黄惟灏 董济海

(浙江省淡水水产研究所)

提 要

本文介绍了不标记抗体酶免疫测定法检测鱼害粘球菌烂鳃病的试验结果。试验表明,鱼害粘球菌不同菌株的菌体都能与其各特异抗血清交叉反应,用酶标记显示棕色,获得阳性反应,其细长弯曲的菌体形态在光学显微镜下清晰可见。用正常兔血清或含吐温 20 0.1M, pH 7.4 的磷酸缓冲液或吸收血清,或用 Cg25 和 Cg27 菌株代替鱼害粘球菌的对照组,酶标记都呈阴性反应,菌体不呈棕色,在光学显微镜下观察有明显差别。以健康草鱼鳃上的粘液作对照试验,粘液本身呈淡黄色,只有红血球呈深棕色。

这种检测法对粘细菌病的流行病学调查或用于诊断鱼病有一定实际意义。这一检测技术对其他鱼类的病毒病的病原定位、传染源、传染途径的探索,以及对细菌性鱼病或寄生虫鱼病的研究也可能是适用的。

酶免疫测定法是六十年代的一项血清学新技术。它具有敏感性高、特异性强、方法简便、染色标本能长期保存等优点。国内外在应用于人、畜、禽和植物的寄生虫、细菌或病毒病原的快速检测、定位等方面,已有比较广泛的研究。但应用于鱼病的研究,迄今还未见报道。

本试验的目的是为了探索不标记抗体酶免疫测定法^[1]检测鱼害粘球菌 (*Myxococcus piscicola*) 烂鳃病病原的可能性及其适宜条件、影响因素,并试图为鱼类的病毒病或其他细菌性鱼病、寄生虫病等的研究提供新的方法。

为了探索这种可能性,我们首先用此法对 Cg9、G4 等十株鱼害粘球菌与七株相应的特异抗血清作了鉴别性试验。在此基础上,又在草鱼粘细菌烂鳃病的流行病学调查中进行了病原的检测。获得了良好的结果。

材 料 和 方 法

(一) 材 料 来 源

①试验菌:(甲)鉴别性试验菌选择经鉴定属于鱼害粘球菌的 G4、Cg4、Cg6、Cg9、

* 本工作中承中国科学院上海生物化学研究所潘家秀同志具体指导,并得到冯敏绮同志的帮助。在此一并致谢。

Cg11、Cg13、Cg16、Cg78-1、B76-7-1、A5 等菌株⁽¹⁾。用胰蛋白胨液体培养基,经 24—48 小时 26°C 恒温增殖后,直接挑取此培养物涂片。(乙)实际病例的检测性试验,采用典型烂鳃病草鱼鳃部病灶上具有大量粘细菌的淡黄色粘液,直接涂片。

②特异抗血清:采用兔抗 Cg6、Cg9、Cg12、Cg13、Cg15、Cg16 及 G4 等菌株的抗血清作鉴别性试验,用兔抗 Cg9 菌株的抗血清作病原检测性试验⁽²⁾。

③羊抗兔 IgG 血清、辣根过氧化物酶-抗辣根过氧化物酶可溶性复合物(PAP)和 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)^[3]均由中国科学院上海生物化学研究所提供。

(二) 试验方法

1. 鉴别性试验

①在清洁的载玻片上,按一定间距,分别均匀地涂上少量纯培养的供试菌,然后在电磁搅拌器上微热烘干,用丙酮固定 5 分钟,置于内含 0.05% 吐温 20 的 0.1 M, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS-T)中浸数分钟。

②与特异抗血清反应:取出上述载玻片,用滤纸条吸去玻片上的水份,在每一涂菌区分别敷贴小块擦镜纸,加上已用 PBS-T 稀释成 1:100—1:200 的特异抗血清,置于湿盒内,37°C 温育 30 分钟。镊去擦镜纸,用 PBS-T 搅拌洗涤三次,每次 20 分钟。

③与羊抗兔 IgG 血清反应:操作方法和步骤同②,此抗血清的稀释度为 1:60。

④与 PAP 反应:操作方法和步骤也同②。PAP 的稀释度为 1:250。每次搅拌洗涤时间为 15 分钟。

⑤显色反应:显色液新鲜配制,即把 20 毫克 3,3'-二氨基联苯胺溶于 40 毫升 0.05 M, pH 7.6 的 Tris-HCl 缓冲液中。将玻片浸入,在 25°C 的黑暗处放置 10 分钟。取出玻片,加入 16 滴 H₂O₂ (1 滴 29% H₂O₂ 与 28 滴 0.05 M, pH 7.6 的 Tris-HCl 缓冲液的混合液)后,再把玻片浸入,在 25°C 黑暗处放置 20 分钟。流水冲洗 15 分钟。

⑥封片:将冲洗过的片子浸入蒸馏水中数分钟,按常规通过 50—100% 酒精脱水,二甲苯透明,国产中性树胶或加拿大树胶封片。光学显微镜检查。

2. 病原检测性试验:

用弯头镊子镊取新鲜病鱼鳃病灶上具有大量粘细菌(先镜检初步观察)的少量淡黄色粘液,作为菌抗原材料,在已涂有甘油蛋白的载玻片上进行涂片,并经自然干燥或微热烘干后,用丙酮固定 5 分钟。如果所制得的片子数量不多,不便立即进行试验,则可放入干燥器内,暂存冰箱中。试验时,将片子浸入 0.1 M、pH 7.4 的 PBS-T 中数分钟,然后按上述方法 1 的操作程序②开始,一一进行免疫反应、显色和制片观察。

(1) 陈月英、董济海、黄惟颢,1979 年。从淡水鱼分离的粘细菌的菌种鉴定。一九七九年全国鱼病会议资料汇编。

(2) 黄惟颢、陈月英、董济海,1979 年。从淡水鱼分离的粘细菌的血清学研究。一九七九年全国鱼病会议资料汇编。

3. 对照试验

(1) 菌体或粘液对照

- ①用 Cg25 或 Cg27 株(未定种)粘细菌菌体作为鱼害粘球菌菌体抗原的对照。
- ②用健康草鱼鳃粘液作为病鱼鳃病灶淡黄色粘液的对照。

(2) 抗血清对照

- ①正常兔血清或 PBS-T 分别作为代替特异抗血清的对照。
- ②以含有 1.2×10^{12} 细胞数/ml 的 Cg9 株的菌悬液加于兔抗 Cg9 株的抗血清中所得到的吸收血清作为特异抗血清的对照。

结 果

在光学显微镜下观察鉴别性试验结果如表 1 所示。鱼害粘球菌不同菌株的菌体都能与其各特异抗血清交叉反应,用酶标记显示棕色,获得阳性结果,其细长弯曲的菌体形态在光学显微镜下清晰易见。用正常兔血清或 PBS-T 或吸收血清,或用 Cg25 和 Cg27 株菌代替鱼害粘球菌的对照,酶标记都呈阴性结果,菌体不显棕色,在光学显微镜下观察其易见性,与前者有着明显的差别。试验表明,这种显色结果是特异性的抗原-抗体反应所致。

在鉴别性试验成功的基础上,又在流行病学调查中作了病原的实际检测性试验。从调查所得的十八只病鱼塘的 27 尾烂鳃病鱼的检测性试验,得到了与鉴别性试验相类似的结

表 1 鉴别性试验结果

结 果 抗血清	抗 原													
	Cg4	Cg6	Cg9	Cg11	Cg12	Cg13	Cg16	Cg78-1	B76-7-1	A5	G4	Cg25	Cg27	
Cg6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Cg9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Cg12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Cg13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Cg15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Cg16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
G4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
正常兔血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

说明: G4 菌株由中科院水生生物研究所提供。

注: (+)表示呈阳性反应,(-)表示呈阴性反应。

果。如表 2 所示,用病灶粘液上的粘细菌与鱼害粘球菌的 Cg9 株的特异抗血清发生交叉反应,在光学显微镜下能清晰地观察到显示棕色的粘细菌菌体。以正常兔血清或 PBS-T 或吸收血清代替特异抗血清的对照试验均呈阴性结果,菌体不显色,在光学显微镜下观察,其易见性比纯培养的对照试验更差。用健康草鱼鳃上的粘液作对照试验,粘液本身呈现淡黄色,只有红血球呈现深棕色。

表 2 病原检测性试验结果

取样日期	材 料 来 源	鱼 别 及 病 症	尾 数	镜 检	酶 标 记	
					试 验	对 照
79.7.28	本所 6 号池	当年草鱼烂鳃	1	有粘细菌	+	-
8.16	吴兴溪西勤俭渔场施介滩塘	" "	1	"	+	-
9.11	" " 芦介庄渔场大白马塘	" "	2	"	+	-
9.11	本所 8 号池	" "	2	"	+	-
9.12	吴兴溪西南浜渔场蟹子角塘	" "	1	"	+	-
9.14	" " 查介旦渔场芦鸡丝塘	" "	3	"	+	-
9.21	" " 查介旦向阳队姚菩萨塘	" "	2	"	+	-
9.21	" " 查介旦建新队三角上塘	" "	2	"	+	-
9.21	" " 新民渔场张家塘	" "	1	"	+	-
9.21	" " 新民渔场高塘	" "	1	"	+	-
10.24	本所里驾鸯塘	" "	1	"	+	-
80.5.12	本所 3 号池东半只	二龄青鱼烂鳃	1	"	+	-
5.15	本所 10 号池	二龄草鱼烂鳃	3	"	+	-
5.28	余杭县丁河公社车家坟四队姚空池	二龄草鱼烂鳃	1	"	+	-
5.29	吴兴新溪永丰一队里汉大塘	三龄草鱼烂鳃	1	未见菌	+	-
5.29	" " " " 北半只塘	二龄草鱼烂鳃	1	有粘细菌	+	-
6.11	吴兴溪西联星大队渔场王家塘	当年草鱼,白头白嘴	4	"	+	-
6.17	吴兴新溪永丰一队段哈拉塘	三龄草鱼烂鳃	1	"	+	-

讨 论 和 小 结

1. 纯培养的鱼害粘球菌或病鱼鳃患部淡黄色粘液上的粘细菌,与兔抗鱼害粘球菌的特异抗血清结合,用 PAP 参与反应,通过底物染色,均呈阳性结果,能使本来纤细难辨的菌体显出棕色,在光学显微镜下清晰易见。相反,各对照组都呈阴性结果。显然,这种显色反应具有较高的特异性。

2. 根据我们对大量的草鱼烂鳃病鱼的解剖、观察,烂鳃病灶上的淡黄色粘液往往是鱼害粘球菌群集的“大本营”。用这种粘液涂片进行酶免疫测定的阳性检出率较高。由此表明,用此方法作粘细菌病的流行病学调查的过筛工具或诊断疾病具有一定的实际意义。试验获得的良好结果还表明,这一新技术对鱼病的其它病原研究,特别是对在光学显微镜下难以观察或鉴别的鱼类病毒病的病原定位及其传染源或传染途径的探索,对其它细菌性鱼病或寄生虫鱼病的研究也可能是适用的。

3. 由于病鱼来自天然水域,鱼害粘球菌又具有大量分泌粘液的特性,其病灶上除了

存在病原菌之外,势必存在不少污泥或其他附着物。因此,在取材涂片时,为使片子的背景清晰,除了要预试抗血清的最适稀释度外,还应尽量剔除粘液上的污泥什物;可将粘液放在干净的玻片上,加入少量无菌水,使粘细菌分散到水中后再以菌液进行涂片;也可以从镜检过的片子上取材涂片。片子要涂得均匀,稀薄,以免背景模糊,菌体难以辨别而影响阳性检出率。涂好的片子经自然干燥或微热烘干后,不宜在室温下久放或保存,以防污染,而应用丙酮固定,放入干燥器内置冰箱中保存。根据我们的试验,用这种方法,保存时间达五个月,其抗原性仍不受影响。因此,本法可以用于现场分散制片,带回实验室集中检测或保存。

4. 在实际病例检测试验中,曾观察到某些试验区 and 对照区有非特异性显色反应。(1) 当片子涂得过厚或不均匀而形成颗粒状堆集物时,酶标记结果会使这些堆集物出现非特异显色。我们认为,这可能是由于堆集物本身非特异吸附 PAP 或吸附抗血清的结果。采用适当稀释粘液及均匀涂片的方法,特别是确定抗血清的最适稀释度^[4],就能消除这类非特异显色的干扰;(2) 由于病鱼鳃部受到粘细菌的感染,使病变区域的细胞组织呈现“侵蚀性出血”^[2],因而,病灶粘液上会有红血球存在。红血球的血红蛋白具有铁卟啉基团,它与显色剂反应,使红血球的胞浆呈深棕色而其核不显色。尽管出现这种非特异显色,但被检菌体从形态上仍容易辨别。

参 考 文 献

- [1] 潘家秀、冯敏琦、林南琴、鲍璋、徐维奇、许谷星、沈仁澄, 1979。鲤 (*Cyprinus carpio*) 促性腺激素释放激素分泌核群的酶免疫细胞化学定位。实验生物学报12(4):305—314。
 [2] 湖北省水生生物研究所鱼病研究室, 1975。鱼病防治手册, 91—92。科学出版社。
 [3] 徐宜为, 1979。实验免疫学技术, 34—57。科学出版社。
 [4] 加藤兼房、浜口好孝、石川荣治, 1976。酵素の新しい利用技术, III 酵素免疫测定法(2)。化学と生物, 14(12): 817—824。

EXPERIMENT ON THE EXAMINATION OF *MYXOCOCCUS PISCICOLA* BY THE ENZYME-IMMUNOASSAY METHOD

Chen Yueying, Huang Weihao and Dong Jihai

(Freshwater Fisheries Research Institute of Zhejiang)

Abstract

By using unlabelled enzyme-immunoassay method to examine the gill disease caused by the bacteria *Myxococcus piscicola* good results were obtained. The experiments manifest that the bacteria from different strains gave cross reaction to specific anti-serum, and the enzyme-immunoassay shows positive reaction. A brown color appeared, and the curved slender bacteria could easily be observed under the microscope. In the cross set, including the normal rabbit serum, PBS-T, the absorbed serum, the Cg25 strains or Cg27 strains were used to substitute the bacteria for checking. The results all

gave negative reaction, and no brown color appeared. Evident differences could be distinguished under microscope. If the mucus is taken from the gills of the healthy grass carp for checking, it appears light yellow in color, only the red blood corpuscles giving dark brown color.

This method of examination has certain practical uses for the survey of prevailing mucous bacteria disease and for the diagnosis on other fish diseases. It may be also useful in localizing pathogen of virulent diseases, in tracing the source and the path of infection, and in studying bacterial and parasitological diseases of fishes.